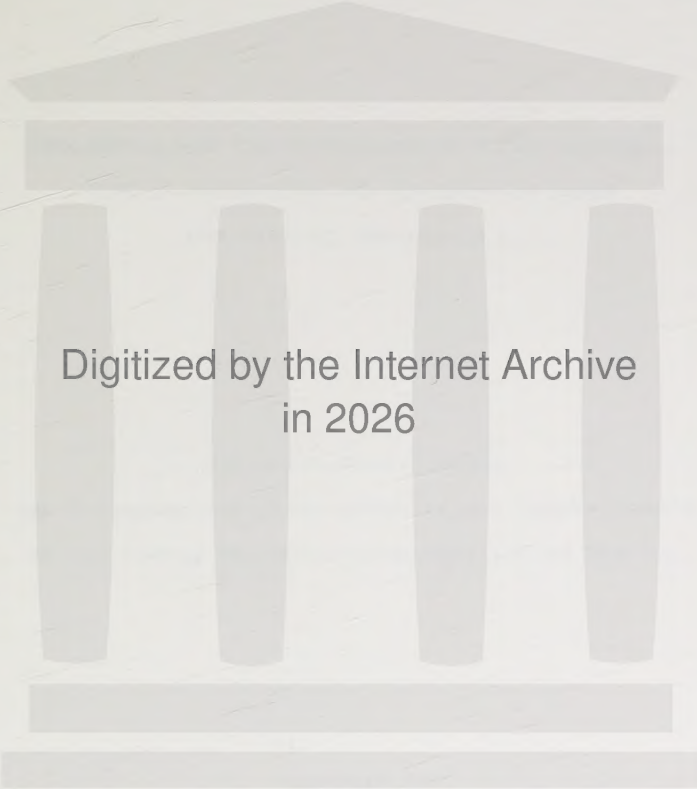


ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES PANKREAS-
LIPASE-INHIBITORS AUS LIPIDEN VON SAMEN
DES PAPAVER SOMNIFERUM L.

Gerd Schwinghammer

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0076

Dissertationsdruck

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H.H. Naumann

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES PANKREAS-
LIPASE-INHIBITORS AUS LIPIDEN VON SAMEN
DES PAPAVER SOMNIFERUM L.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerd Schwinghammer
aus
Augsburg

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.H. Naumann
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1977



Meiner lieben Mutter
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung	1
B	Theoretischer Teil	2
	I. Neuere Vorstellungen von der Patho- genese der akuten Pankreatitis	2
	II. Vorkommen und Bedeutung natürlicher Enzyminhibitoren	6
	III. Bemerkungen über die Enzymgruppe der Lipasen	7
	IV. Zusammenfassung	14
C	Experimenteller Teil	16
	I. Material und Methoden	16
	1. Material	16
	2. Methoden	18
	II. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	29
	1. Hemmtests mit Mohnlipid-Rohextrakt	29
	2. Isolierungsverfahren	34
	3. Versuche zur Charakterisierung des Hemmlipids	43
D	Zusammenfassung	48
E	Literaturverzeichnis	50

A Einleitung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Charakterisierung eines Pankreaslipase-Inhibitors aus einem Lipidextrakt, der aus Samen von *Papaver somniferum* L. gewonnen wurde.

Es wurde von folgenden zwei Überlegungen ausgegangen:

1. Nach neueren Erkenntnissen über die Pathogenese der akuten Pankreatitis scheint den lipolytischen Enzymen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Krankheit zuzukommen.

Ein Pankreaslipase-Inhibitor hätte somit große klinische und pharmakologische Bedeutung.

2. Die Wirkungsmechanismen bei der Hemmung hydrolytischer Enzyme durch natürliche Inhibitoren sind bislang vorwiegend an Proteasen-Inhibitoren untersucht worden.

Es stellte sich also die Frage, ob für Lipase ähnliche Hemmstoffe wie für Proteasen gefunden werden könnten.

B Theoretischer Teil

I. Neuere Vorstellungen von der Pathogenese der akuten Pankreatitis

Seit der Jahrhundertwende wird die Autodigestion des Pankreas als der wesentliche pathogenetische Faktor für die akute Pankreatitis betrachtet.

Die für das Krankheitsbild charakteristischen pathologisch-anatomischen Befunde am Pankreas und in seiner Umgebung (Pankreasparenchymnekrosen, Fettgewebnekrosen, Oedeme, Haemorrhagien) lassen sich am ehesten als Folgen einer lokalen Wirkung von Verdauungsenzymen deuten.

Den proteolytischen Enzymen, insbesondere dem Trypsin, wurde bis in jüngster Zeit die Hauptbedeutung zugesprochen. Heute erscheint diese Theorie jedoch fraglich, da bei tierexperimentell erzeugten Pankreatitiden aktives Trypsin im Pankreas nicht nachgewiesen werden konnte.

Welche Enzyme nun für die Entstehung der akuten Pankreatitis verantwortlich zu machen sind, ist Gegenstand lebhafter Diskussionen. (1, 2, 3, 4, 5)

Neuere Untersuchungen machen in erster Linie die folgenden drei Enzyme für die Entstehung einer akuten Pankreatitis verantwortlich: (3, 6, 7, 8, 9)

- a) Pankreaslipase
- b) Phospholipase (Phosphatidase)
- c) Elastase

Bei der Prüfung der Frage, welche Enzyme des Pankreas dessen Autodigestion provozieren könnten, müssen die histopathologischen Charakteristika der Pankreasnekrose beim Menschen betrachtet werden. Primär handelt es sich um Koagulationsnekrosen des Parenchyms mit rasch eintretender Karyolyse und anschließenden Zerfallerscheinungen der nekrotischen Acini. (10, 11, 5)

Im folgenden sollen kurz die bisherigen Erkenntnisse über die Beziehung der einzelnen Enzyme zur akuten Pankreatitis wiedergegeben werden:

Wie oben bereits erwähnt, wurde in Trypsin ein wesentlicher Auslösefaktor gesehen. Im Tierexperiment konnten nach retrograder Injektion von Trypsin in den Ductus pancreaticus ausgedehnte Haemorrhagien und intra- sowie peripankreatische Oedeme beobachtet werden. Nekrosen traten jedoch kaum auf, allenfalls in Form von primären Kolliquationsnekrosen, die keineswegs dem Bild entsprechen, das eine akute Pankreatitis beim Menschen bietet. (5). Zudem wird das injizierte Trypsin rasch durch körpereigene Trypsininhibitoren inaktiviert. (4)

Chymotrypsin bewirkt keine wesentlichen Schädigungen. (12)

Nach intrapankreatischer Injektion von Elastase kommt es zu morphologischen Befunden, die denen der „Trypsin-Pankreatitis“ ähnlich sind. (6,7,8)

Zusammenfassend betrachtet stehen nach Injektion aktiver proteolytischer Enzyme in den Pankreasgang überwiegend die Zeichen einer Kapillar- bzw. Gefäßschädigung im Vordergrund. Die bei der akuten Pankreatitis auftretenden Oedeme und Haemorrhagien können hierdurch erklärt werden. Die Ausbildung der Parenchymnekrosen scheint jedoch nicht auf einer proteolytischen Autodigestion zu beruhen.

Während die pathogenetischen Überlegungen bisher fast ausschließlich auf die proteolytischen Enzyme ausgerichtet waren, wurde den lipolytischen Verdauungsenzymen des Pankreas wenig Beachtung geschenkt. Die Betrachtung dieser Enzyme scheint aber, insbesondere bei Annahme eines möglichen Refluxes von Galle oder gallensäurehaltigem Duodenalinhalt in den Pankreasgang, von Interesse, da sie durch Gallensäuren aktiviert werden können.

BALO (13) äußerte vor Jahrzehnten erstmals die Vermutung, daß Lipase für die Entstehung der Pankreasnekrose verantwortlich sei. Doch erst in jüngster Zeit beobachtete WANKE (14) nach Lipaseinstillation in den Pankreasgang von Hunden Veränderungen, die denen bei der Pankreatitis des Menschen ähnelten.

ANDERSON et al. (12) berichten über die Auslösung

haemorrhagischer Pankreasnekrosen nach intraduktulärer Infusion von Pankreaslipase. In Gegenwart von aktivierenden Substanzen (Gallensäuren) verursachte die Lipase typische Fettgewebsnekrosen. (15)

Ein weiteres Verdauungsenzym des menschlichen Pankreas ist die Phospholipase A, die als Bestandteil tierischer Gifte seit längerem bekannt ist, als Pankreasenzym jedoch erst 1962 von MAGEE et al. (16) nachgewiesen wurde. Sie katalysiert den Abbau von Phospholipiden wie Lecithin und Kephalin, wodurch deren Lysoverbindungen (Lysolecithin, Lysokephalin) gebildet werden, die eine ausgeprägte Cytotoxizität besitzen. (17)

Phospholipase A allein bewirkt bei Instillation in den Pankreasgang von Ratten keine Nekrosen. Aber schon in Gegenwart geringster Gallenmengen kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer weitgehenden Nekrose des ganzen Pankreas, da Galle mehrere Prozent Lecithin enthält. In einem solchen nekrotischen Pankreas können hohe Konzentrationen von Lysolecithin nachgewiesen werden. (4,17,3). Im Pankreasgewebe von an akuter Pankreatitis Verstorbenen wurde von denselben Autoren eine Zunahme von Lysolecithin festgestellt.

Elastase als weiteres Pankreasenzym wirkt proteolytisch. Sie wird durch Pepsin aktiviert. Ihre Bedeutung bei einer Pankreatitis soll darin bestehen, daß sie die glykoproteidhaltigen Kittsubstanzen der elastischen Fasern abbaut und auf diese Weise Blutungen verursacht. (9)

Zusammenfassung:

Die oben geschilderten neueren Erkenntnisse von der Pathogenese der akuten Pankreatitis zeigen, daß aktivierte proteolytische Enzyme nicht mehr als ätiologisch ausschlaggebend angesehen werden können. Zwar werden durch Proteasen Kapillar- und Gefäßschäden hervorgerufen, aber die Ausbildung weitreichender Fettgewebsnekrosen kann nur mit der Wirkung lipolytischer Enzyme erklärt werden.

Somit stellt sich die Aufgabe, nach Inhibitoren für diese Enzyme zu suchen.

II. Vorkommen und Bedeutung natürlicher Enzym-Inhibitoren

Natürliche Enzym-Inhibitoren spielen bei biologischen Regulationsvorgängen eine außerordentlich bedeutende Rolle. (19). Die Wirkungsmechanismen bei der Hemmung hydrolytischer Enzyme durch natürliche Inhibitoren konnten besonders deutlich am Beispiel der Proteasen-Inhibitoren dargestellt werden, nachdem BAUER, KRAUT, FREY und WERLE (20) im Jahre 1929 einen Hemmstoff für Kallikrein aus Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes beschrieben hatten. Diese Inhibitoren wurden seither eingehend erforscht. (21,22). Ihre physiologische Bedeutung liegt darin, biologisch wichtige Proteine vor proteolytischen Enzymen zu schützen,

wobei sie deren katalytische Aktivität steuern, indem sie sie passager hemmen.

Nach MANSFIELD et al. (23) sollen pflanzliche Inhibitoren eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Lebensform spielen, indem sie die Autolyse und den damit verbundenen vorzeitigen Energieverlust hemmen.

In vielen Organen finden sich Enzyme und deren Inhibitoren nebeneinander; dies führte zu der Arbeitshypothese, daß ein Inhibitor gemeinsam mit dem Substrat des betreffenden Enzyms vorkommt. (24). Somit erscheint es aussichtsreich, in substratreichen Geweben bzw. Pflanzen nach einem spezifischen Enzym-Inhibitor zu suchen.

Erste Erfolge in dieser Richtung erzielte FEUTH (25,26), als er einen bis dahin unbekannten Pankreaslipase-Inhibitor aus Samen von *Arachis hypogaea* L. darstellen konnte, die einen hohen Lipidgehalt aufweisen.

III. Bemerkungen über die Enzymgruppe der Lipasen

1. Definition

Die Lipasen gehören zu einer Untergruppe der Hydrolasen, nämlich den Esterasen. Sie katalysieren die Spaltung von Fetten zu Glycerin bzw. Gly-

ceriden und Fettsäuren. (27). Die Pankreaslipase hydrolysiert Triglyceride mittel- und langkettiger Fettsäuren. (28,29,30,31,32). Da Triglyceride nicht wasserlöslich sind, müssen sie zur enzymatischen Spaltung in emulgierter Form vorliegen. (32, 28)

2. Vorkommen lipolytischer Enzyme

Eine Untersuchung von MENDEL und Mitarbeitern (33) erbrachte, daß Lipasen in der Natur ubiquitär verbreitet sind. Im folgenden soll kurz skizziert werden, in welchen Sekreten, Exkreten und Geweben Lipasen gefunden werden konnten:

a) Serum

Im Serum kommen mehrere nahe miteinander verwandte lipolytische Enzyme vor, deren Spezifitätsbereiche sich weitgehend überschneiden; dadurch ist die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten sehr schwierig. ALDRIDGE (34) und später AUGUSTINSSON (35) wiesen nach, daß es sich zumeist um Esterasen handelt.

Echte Lipase ist im normalen Serum nur in geringer Menge vorhanden. (36). Nur bei akuter Pankreatitis sowie bei perforierten Duodenalgeschwüren steigt die Konzentration der echten Lipase stark an, wobei nachgewiesen werden konnte, daß es sich um Pankreaslipase handelt. (9,37)

b) Magen

Die Magenlipase unterscheidet sich von der Pankreaslipase durch ein kleineres Molekulargewicht und ein niedrigeres pH-Optimum (pH 4,7); zudem ist sie sehr säurestabil (pH 2). (38). Sie katalysiert insbesondere die Spaltung von Triglyceriden mit kurzkettigen Fettsäuren (vier bis acht Kohlenstoffatome).

c) Dünndarm-Mucosa

Die Vorgänge bei der Resorption von Triglyceriden aus dem Verdauungstrakt haben schon früh das Interesse von Physiologen und Biochemikern geweckt, da die Aufnahme wasserunlöslicher Substanzen eine bemerkenswerte Leistung der Darmschleimhaut bedeutet.

In den Arbeiten von SENIOR (40) sowie DI NELLA et al. (41) kann der heutige Wissensstand von den Vorgängen bei der Fettresorption nachgelesen werden.

In der Dünndarmmucosa konnte eine Lipase gefunden werden, die bevorzugt Tributyrin hydrolysiert. (41). Außerdem soll sie imstande sein, β -Monoglyceride langkettiger Fettsäuren umzusetzen. (42)

d) Harn

Bei mehreren Autoren findet sich die Ansicht, daß Pankreaslipase über den Harn ausgeschieden würde. (43,44,45). Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen von GOEBELL und RICK widersprechen jedoch dieser

Vermutung. Selbst im Harn von an Pankreatitis Erkrankten konnte keinerlei Lipaseaktivität nachgewiesen werden. (46,28,47,48)

e) Pankreas

Pankreaslipase wird in den Acinuszellen des exokrinen Anteils des Pankreas synthetisiert. Diese Zellen produzieren weitere wichtige Verdauungsenzyme, wie Phospholipase A und B, Amylase, Nuclease und verschiedene Proteasen bzw. deren Vorstufen. (49)

3. Eigenschaften der Pankreaslipase

Bei der Pankreaslipase handelt es sich um ein wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 48 000. Dabei soll es sich um eine einzige Peptidkette handeln, die 4 Methionin-, 7 Tryptophan- und 10 Histidin-Moleküle aufweist. Außerdem sollen je Molekül 6 Disulfidbrücken und 2 freie SH-Gruppen vorhanden sein. (32)

Pankreaslipase hydrolysiert vor allem Triglyceride mittel- und langkettiger Fettsäuren. (28,29,30,31,32,50). Der Abbau erfolgt meist nur bis zu β -Monoglyceriden. Da Triglyceride wasserunlöslich sind, müssen sie bei der enzymatischen Spaltung in emulgierter Form vorliegen. (28,32). Dies wird im Magen-Darm-Trakt durch die emulgierende Wirkung der Gallensalze erreicht. (29)

Eine spezifische Aktivitätsbestimmung für Pankreas-

lipase ist nur mit Triolein bzw. mit dem zu 85 % aus Triolein bestehenden Olivenöl als Substrat möglich, da andere Triglyceride (besonders Triglyceride mittel- und kurzkettiger Fettsäuren wie Triacetin, Tributyrin und Tricaprylin) auch von Schweineleberesterase hydrolysiert werden. (29, 51, 52). Das Phänomen, daß Pankreaslipase im Vergleich zu Triolein eine viermal höhere Aktivität gegenüber Olivenöl entwickelt, konnte bisher noch nicht erklärt werden. (29)

Im Gegensatz zur Carboxylesterase entfaltet die Pankreaslipase ihre hydrolysierende Wirkung nur an der Grenzfläche zwischen Fetttröpfchen und wäßriger Phase, d.h. sie wirkt nur auf wasserunlösliche Substrate, die in einer Emulsion vorliegen müssen. (28, 30, 33). DESNUELLE konnte nachweisen, daß die „interface lipides-eau“, die Interphasenkonzentration, ausschlaggebend für die Aktivität der Pankreaslipase ist. Je größer der Öl-Wasser-Grenzflächenbereich ist, desto mehr Enzymmoleküle können an ihn adsorbiert werden. Das bedeutet, daß die Hydrolyserate dann ihr Maximum erreicht, wenn sämtliche Enzymmoleküle sich im Interphasenbereich befinden. Für diese, im Vergleich zu den übrigen Enzymen ungewöhnliche Wirkungsweise sieht DESNUELLE zwei Erklärungen:

1. Er vermutet, daß das Lipasemolekül - anders als die meisten Proteine - einen großen hydrophoben Anteil trägt, der die Adsorption an die Interphase erleichtert und der letztlich ausschlaggebend wäre für die spezifische Reaktionsform der Lipase in heterogenen Systemen.

2. Aus der Tatsache, daß sich die Lipase in einem homogenen System völlig inaktiv verhält, zieht DESNUELLE den Schluß, daß das Enzymmolekül erst im Augenblick der Adsorption an die Interphase aktiviert wird. Dies soll durch eine gewisse Veränderung innerhalb des Moleküls ermöglicht werden, die erst ein reaktionsbereites aktives Zentrum schafft.

BENZONANA, DESNUELLE und andere (53,54,55) haben die Wirkung einiger Effektoren auf die Hydrolyse langkettiger Triglyceride durch Pankreaslipase untersucht und berichten von folgenden Ergebnissen:

1. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse langkettiger Triglyceride durch Lipase wird in Gegenwart von Natriumchlorid und ähnlichen Salzen verringert, da hierbei langkettige Seifen entstehen, die sich in der Interphase anhäufen und die Reaktion zwischen Enzym und Substrat behindern sollen.

2. Ferner wurde die Wirkung von Gallensalzen und Kalziumionen untersucht. (55,56). Beide Substanzen waren schon in früheren Arbeiten als Aktivatoren beschrieben worden. (57,58).

BENZONANA kam zu dem Ergebnis, daß bereits relativ geringe Mengen an Gallensalzen die bei der Lipolyse entstehenden Seifen aus der Interphase entfernen, wobei wasserlösliche Micellarassoziationen gebildet werden. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine aktivierende Wirkung der Gallensalze, sondern vielmehr um einen desinhi-

bitorischen Effekt: qua definitione darf eine enzymatische Reaktion nur dann als aktiviert bezeichnet werden, wenn ihre Initialgeschwindigkeit durch Zugabe der betreffenden Substanz erhöht wird.

In höherer Konzentration wirken Gallensalze stark inhibitorisch. (55)

Kalziumionen können die Hemmwirkung von Gallensalzen verhindern. Es konnte nachgewiesen werden, daß sie sich an das Enzym anlagern; durch die so hervorgerufenen elektrochemischen Veränderungen wird die Bindungsbereitschaft zwischen Lipase und Triglyceridmolekül beeinflußt. (55)

Als Lipase-Inhibitor ist Diaethyl-p-Nitrophenylphosphat bekannt. DESNUELLE und Mitarbeiter konnten nachweisen, daß diese Verbindung in wäßriger Lösung keinerlei Hemmwirkung besitzt; (31,32); in Form einer Emulsion mit Gummi arabicum wird Lipase jedoch sofort und irreversibel gehemmt.

Erst in jüngster Zeit wurden noch weitere antilipolytisch wirkende Substanzen bekannt. So zeigt Phenylisopropyl-Adenosin (TH 162), ein neu synthetisiertes Adenosin-Derivat, eine starke Hemmwirkung. (59)

KLISSIUNIS und MYCONIATIS (60) berichten über die Lipase-Inhibition durch einige Pharmaka. So sollen Natriumnicotinat und Propanolol auf Lipase hemmend wirken.

MATTSON et. al. (61) haben festgestellt, daß auch normale Alkohole eine lipase-inhibitorische Wirkung zeigen, wobei der Grad der Hemmung von der Kettenlänge abhängig ist und bei Alkoholen mit zehn Kohlenstoffatomen ein Maximum erreicht. Ursächlich für die Hemmwirkung soll die Adsorption des jeweiligen Alkohols an das Substrat sein; dadurch wird das Enzym abgeblockt, und eine Enzym-Substrat-Komplexbildung verhindert. Diese Theorie gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß die Hemmwirkung durch Zugabe von Enzym nicht verringert werden kann, wohl aber durch Erhöhung der Substratmenge.

IV. Zusammenfassung

1. Bei der Pankreaslipase handelt es sich, wie bei den Proteasen, um ein wasserlösliches Protein.
2. Während Proteasen nur im homogenen System mit ihren entsprechenden Substraten reagieren, entfaltet Pankreaslipase ihre enzymatische Aktivität nur im heterogenen System; d.h. echte Lipase spaltet nur wasserunlösliche, emulgierte Substrate, insbesondere Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren.
3. Der Pankreaslipase scheint eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis zuzukommen.

4. Genauere Kenntnisse über die katalytischen Vorgänge in heterogenen Systemen und über die Bedeutung der Öl-Wasser-Interphase liegen bisher kaum vor.

5. Für die Suche nach einem natürlichen Inhibitor für Pankreaslipase müssen die Erkenntnisse der Proteasen-Inhibitor-Forschung als Leitfaden herangezogen werden.

C Experimenteller Teil

I. Material und Methoden

1. Material:

1.1 Enzym:

Lipase (E.C. 3.1.1.3.) aus Schweinepankreas, SERVA

Aktivität: 1 mg spaltet bei pH 7,4 und 37° C pro Stunde 15 bis 20 µval Essigsäure aus Triacetin oder 75 bis 125 µval Ölsäure aus Olivenöl.

Es handelt sich um eine echte Lipase, die nur an der Oberfläche emulgierter Öle aktiv wird.

1.2 Substrat:

Oliveöl (Oleum olivae neutralisatum sterilisatum), SIEGFRIED

1.3 Reagenzien:

Gummi arabicum pulverisatum nach DAB 6;
 Sprühreagenzien der Fa. MERCK;
 1 n Natronlauge Titrisol, MERCK;
 synthetische Mono- und Diglyceride, Vertrieb SERVA

1.4 Lösungs-, Lauf- und Fließmittel:

sämtlich von Fa. MERCK

1.5 Weiteres Material:

DC-Alufohlen für Dünnschichtchromatographie,
Kieselgel 60 F 254, Schichtdicke 0,25 mm,
MERCK;

Kieselgel 60 für Säulenchromatographie,
0,063 - 0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM), MERCK

1.6 Apparate:

Thermostatisiertes Wasserbad der Fa. LAUDA;
Magnetrührer IKA-Combimag-MCO mit Drehzahl-
regler;

Fraktomat Y 3 der Fa. HAKO;

Ultra-Turrax Hochgeschwindigkeitsrührgerät;

Autotitrator D 3 der Fa. METROHM mit Papier-
schreiber

1.7 Glaswaren:

Säule 5 x 100 cm mit Porzellanfritte und
Auslaufhahn mit Teflonküken;

Säule 6 x 80 cm mit Porzellanfritte und
Auslaufhahn mit Teflonküken;

Kieselgelfertigsäule Größe C der Fa. MERCK;
übliche Laborglaswaren

2. Methoden

2.1 Gewinnung des Mohnlipidrohextraktes:

500 g Samen von *Papaver somniferum* werden mit einer Mohnmühle zerkleinert, mit 5 l Chloroform-Methanol-Gemisch 2:1 versetzt und über 5 Stunden bei 5° C intensiv gerührt.

Das Chloroform-Methanol-Gemisch soll den Vorteil haben, dank eines hydrophilen und eines lipophilen Anteils die in den Geweben vorliegenden Lipideiweißbindungen zu zerstören und damit die Extraktion zu vervollständigen. Der gewonnene Gesamtlipidextrakt wird mittels Vakuumfiltration von festen Partikeln befreit, und die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt.

Die so erhaltenen reinen Lipide werden mit Petroleumbenzin und Diaethyläther im Verhältnis 9:1 versetzt und dienen in dieser gelösten Form als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

2.2 Vorbereitung der Testsubstanzen:

2.2.1 Lipasesubstrat:

4 Teile einer 10 g% Gummi-arabicum-Lösung werden 4 Minuten im Starmix gerührt, ein Teil *Oleum olivae* wird zugefügt, und das Gemisch 2 Minuten mit dem Ultra-Turrax emulgiert.

Zur Absättigung der sauren Valenzen von evtl. enthaltenen freien Fettsäuren wird die Emulsion mit NaOH auf pH 10 gebracht

und daraufhin mit HCl auf pH 8,6 eingestellt.

2.2.2 Lipolytisches Enzym:

Für die Untersuchungen wird eine 100 mg% Lösung von Schweinepankreaslipase in Aqua bidest. hergestellt.

2.2.3 Extraktemulsion:

Nach Abdampfen der Lösungsmittel wird die benötigte Extraktmenge abpipettiert, mit 10 g% Gummi-arabicum-Lösung versetzt und 2 Minuten im Ultra-Turrax emulgiert.

2.3 Meßmethoden zur Lipase-Aktivitätsbestimmung:

In der Literatur werden drei verschiedene Meßprinzipien zur Lipase-Aktivitätsbestimmung beschrieben: die Nephelometrie (64), die Manometrie (65) und die Titrimetrie (66).

Für die folgenden Untersuchungen wurde der titrimetrischen Methode der Vorzug gegeben, da sie relativ schnell und einfach durchzuführen ist. Die bei der lipolytischen Spaltung freiwerdenden Fettsäuren werden hierbei mit Lauge titriert. Der Verbrauch an Alkali dient als Maßstab für die Enzymaktivität.

2.3.1 Erstes Meßverfahren (Titration nach Vorinkubation):

Das zuerst angewandte Verfahren stellt eine Modifikation der von TIETZ (62) und WEBER (63) angegebenen Methode dar.

a) Durchführung der Tests:

Um die antilipolytische Aktivität der Hemm-
substanz bestimmen zu können, sind 4 Titra-
tionsansätze erforderlich:

- 1) Substratleerwert zur Bestimmung der Eigen-
azidität der Substratemulsion;
- 2) Lipidleerwert zur Bestimmung der Eigen-
azidität der Lipidemulsion;
- 3) Lipasevergleichswert zur Ermittlung der
ungehemmten Enzymaktivität gegenüber Sub-
strat;
- 4) Hemmansatz zur Ermittlung der Lipaseakti-
vität unter Inhibitoreinwirkung.

Alle vier Testansätze werden mit 50 mM Tris-
lösung gepuffert, über einen Magnetrührer
30 Sekunden gemischt und anschließend im
Wasserbad bei 37° C für 30 Minuten inkubiert.
Danach werden die enthaltenen sauren Valenzen
mit Hilfe einer Bürette mit 0,05 n NaOH ti-
triert, bis ein eindeutiger Farbumschlag des
zugesetzten Indikators Thymolphthalein ins
Hellblaue festzustellen ist.

b) Auswertung:

Die ungehemmte Hydrolyserate errechnet sich
aus der Differenz Titrationsansatz 3 minus 1.

Die inhibierte Enzymaktivität ergibt sich
aus der Rechnung Titrationsansatz 4 minus
(1 + 2).

c) Zuverlässigkeit der Methode:

Die Genauigkeit der Bestimmung antilipo-

lytischer Aktivität konnte durch folgende Maßnahmen verbessert werden:

- 1) Leerwertbestimmungen der Substrat- und Inhibitoremulsionen bei jedem neu angesetzten Test, da beide Emulsionen titrierbare Azidität besitzen können;
- 2) Doppelbestimmung eines jeden Testansatzes;
- 3) Durchmischung des Analysengutes während der Titration mit einem Magnetrührer;
- 4) exakte Titration mit einer Bürette bei einer Ablesegenauigkeit von 0,01 ml;
- 5) gleichbleibende Beleuchtung zur genauen Feststellung des Indikatorumschlagpunktes, da das Analysengut milchig-weiß ist und der Farbumschlag äußerst schwierig zu beobachten ist; die Tests wurden daher stets nachts bei Neonbeleuchtung durchgeführt.

2.3.2 Zweites Meßverfahren (enzymkinetische Tests):

Nachdem vom Sonderforschungsbereich 51 ein Combi-Titrator D 3 mit Papierschreiber der Fa. METROHM, Herisau, zur Verfügung gestellt werden konnte, war es möglich, enzymkinetische Tests durchzuführen und Reaktionen von Lipase mit Substrat bzw. inhibitorhaltigem Substrat direkt - d.h. ohne Vorinkubation - zu verfolgen.

Es wurde ein von RICK (28) angegebenes Verfahren, das der Bestimmung von Lipaseaktivität im Serum dient, in geeigneter Weise

modifiziert und für die eigenen Untersuchungen eingesetzt.

a) Durchführung der Tests:

Die eingesetzten Substanzen entsprechen jenen beim ersten Meßverfahren. Auf den Zusatz von Puffer- und Indikatorlösung konnte jedoch verzichtet werden, da bei dieser Meßanordnung der pH-Wert automatisch konstant gehalten wird.

Der Combi-Titrator muß vor jedem Einsatz gemäß Arbeitsanleitung mit Eichpuffern auf einen pH-Wert von 7,0 abgeglichen werden. Darauf erfolgt die Einstellung des Arbeits-pH von 8,6, den das Gerät während der gesamten Versuchsdauer konstant halten soll. Das geschieht durch automatisches Einleiten von 0,25 n NaOH aus der eingebauten, 1 ml fassenden Kolbenbürette, die über ein Vorratsgefäß mittels Dreiwegehahn wieder befüllt werden kann.

Der Verbrauch an Lauge wird von einem Zählwerk angezeigt und kann gleichzeitig am Ausmaß der Rechtsbewegung der Schreibspitze abgelesen werden. Zusammen mit dem Papier-vorschub von 2 mm min^{-1} ergibt dies eine Kurve, deren Steigung der lipolytischen Aktivität im jeweiligen Testansatz umgekehrt proportional ist.

Die Arbeitstemperatur von 25°C wird konstant gehalten, wobei Wasser aus einem thermostatisierten Wasserbad durch das doppelwandige

Reaktionsgefäß geleitet wird. In das Analysengut, das von einem Magnetrührer durchmischt wird, ragt ein Präzisionsthermometer, an dem die Temperatur überwacht werden kann.

b) Testauswertung:

Die Lipaseaktivität im jeweiligen Ansatz wird berechnet, indem man den Verbrauch an Mikrolitern NaOH am Registrierpapier abliest und zur Meßdauer in Relation stellt.

c) Vorteile des zweiten Testverfahrens:

- 1) Der Reaktionsablauf kann direkt verfolgt werden; eine zeitraubende Inkubation erübrigt sich.
- 2) Auf den Einsatz von Puffern und Indikatoren kann verzichtet werden, da der pH-Wert automatisch konstant gehalten wird. Vorhandene Eigenaziditäten von Substrat bzw. Hemmlipid können unmittelbar vor der Enzymzugabe titriert werden.
- 3) Das Verfahren liefert gut reproduzierbare Ergebnisse mit einer Genauigkeit von 1 µl Titrierlauge.
- 4) Es erfolgt eine automatische Dokumentation der Tests durch den Papierschreiber.

2.4 Versuche zur Isolierung des Hemmstoffes:

2.4.1 Dünnschichtchromatographische Vorversuche:

Zur qualitativen Auftrennung des Lipid-Rohextraktes erschien die Dünnschichtchromatographie als das Verfahren der Wahl, da sie - im Gegensatz zur Papierchromatographie - relativ einfach gute und leicht reproduzierbare Ergebnisse liefert und die Trennung kleinster Substanzmengen ermöglicht.

Die Grundlagen der DC können bei STAHL (67) und bei RANDERATH (68) nachgelesen werden.

a) Dünnschichtplatten:

Für die Durchführung der dünnschichtchromatographischen Tests wurden DC-Alufolien 20 cm x 20 cm der Fa. MERCK verwendet, die maschinell hergestellt werden und eine gleichmäßige Schichtstärke von 0,25 mm aufweisen. Sie enthalten zudem einen Fluoreszenzindikator, der bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht (254 nm) eine direkte Betrachtung der Substanzflecke zuläßt.

b) Auftragen der Substanzen:

Es empfiehlt sich, vorsichtig mit Bleistift auf den Platten die Startpunkte einzuzeichnen: 1,5 cm vom unteren Rand und 3 cm voneinander entfernt.

Als Entwicklungsstrecke haben sich 14 cm bewährt; hier wird mit einem spitzen Metallstift eine Linie quer über die DC-Folie ge-

zogen, und dadurch die Sorptionsmittelschicht unterbrochen.

Von dem in Petrolaether und Diaethylaether gelösten Mohnlipidextrakt werden mittels Kapillarröhrchen kleine Mengen aufgenommen und auf die Startpunkte aufgetragen. Die Lösungsmittel werden mit einem Fön verdunstet.

c) Laufmittel:

Zur Ermittlung der optimalen Auftrennung des Rohextraktes werden verschiedene, mehr oder weniger polare Laufmittel und -gemische verwendet. Als Orientierungshilfen bei der Auswahl dienten die von verschiedenen Autoren angegebenen „Reihen steigender Elutionswirkung“, die sogenannten elutropen Reihen. (68)

d) Entwickeln der DC-Platten:

Zur Entwicklung der Platten werden geeignete, mit einem Deckel zu verschließende Glaskammern verwendet. Sie werden mit ca. 100 ml Laufmittel gefüllt; die Kammerwände werden mit Filterpapier ausgekleidet, um eine Sättigung der Kammeratmosphäre zu erzielen. Dadurch werden sog. „Randphänomene“ (Abnahme der Wanderungsstrecken zum Plattenrand hin) vermieden; außerdem wird die Laufzeit um etwa $\frac{1}{3}$ verkürzt. (68)

e) Nachweis der aufgetrennten Substanzen:

Da die Kieselgelschicht der verwendeten

MERCK-DC-Folien einen Fluoreszenzindikator (mit Mangan aktiviertes Zinksilikat) enthält, erübrigt sich in den meisten Fällen das Anfärben der Substanzen. Die Chromatogramme werden im Licht einer kurzwelligen UV-Lampe bei 254 nm betrachtet. Substanzen, die Licht entsprechender Wellenlänge absorbieren, erscheinen als dunkle Absorptionsflecke auf fluoreszierendem Grund.

Als Nachweisreagenzien eignen sich auch eine aethanolische Lösung von 2',7'-Dichlorfluorescein bzw. Rhodamin B, die als Aerosole von MERCK im Handel sind, und mit denen die Platten besprüht werden. Bei 2',7'-Dichlorfluorescein erscheinen die Lipide im kurzwelligen UV-Licht als gelbgrün fluoreszierende Flecke. Mit Rhodamin B erhält man rotviolette (im UV-Licht rot fluoreszierende) Flecke auf blaßrosa Grund.

f) Auswertung der Chromatogramme:

Die auf den Chromatogrammen lokalisierten Flecke werden mit einem Bleistift umzeichnet, die Mittelpunkte bestimmt, und deren Abstände von den Startpunkten gemessen. Der Quotient aus den Strecken Start - Fleckmittelpunkt und Start - Laufmittelfront ergibt den R_F -Wert.

$$R_F\text{-Wert} = \frac{\text{Strecke Start bis Substanzzentrum}}{\text{Strecke Start bis Laufmittelfront}}$$

g) Dokumentation der Chromatogramme:

Die gewonnenen Werte (Startpunkte, Substanzflecke, Frontlinie) werden auf Transparentpapier abgepaust und so dokumentiert.

2.4.2 Säulenchromatographische Fraktionierung des Lipidextraktes:

Vorab soll eine kurze Schilderung der Säulenchromatographie-Technik gegeben werden, wie sie bei den Versuchen zu dieser Arbeit angewandt wurde.

a) Vorbereiten der Säulen:

Es werden 2 Säulen (5 x 100 cm und 6 x 80 cm) mit Porzellanfritte und Auslaufhahn mit Teflonküken verwendet. Als Adsorbens dient Kieselgel 60 0,063 - 0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM) der Fa. MERCK. Es wird mit dem d.c. gefundenen günstigsten Laufmittel äquilibriert und in die beiden Säulen gefüllt; über Nacht setzt sich die Füllung und wird kompakt. Vor Auftragen der Lipide läßt man 2 l Fließmittel aus dem aufgesetzten Vorratsgefäß durch die Säulen laufen, um sie durchzuwaschen.

b) Auftragen des Lipidgemisches:

Die Kieselgeloberfläche wird mit einem runden Filterpapier abgedeckt. Vorsichtig werden darauf mit Hilfe einer Pipette 50 g lösungsmittelfreies Mohnlipid aufgetragen, das man durch geringfügiges Öffnen des Auslaufhahns in das Kieselgel einsickern läßt.

c) Trennung der Komponenten:

Nachdem auf die Säulen mit Laufmittel gefüllte Vorratsgefäße gesetzt sind, kann die Trennung durchgeführt werden.

Die Hähne der Säulen werden so weit geöffnet, daß in jeweils 2 min 15 ml Flüssigkeit austropfen; das Eluat wird in zwei Fraktionssammlern aufgefangen. Während der Durchführung der Säulenchromatographie muß peinlichst darauf geachtet werden, daß die Vorratsgefäße ständig ausreichend gefüllt sind, da das Trockenlaufen einer Säule die ganze Arbeit in Frage stellt.

d) Auswertung der Fraktionen:

Zur Lokalisierung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Lipide wird der Inhalt jedes dritten Reagenzglases dc getestet. Fraktionen, die Lipide mit gleichem R_F -Wert enthalten, werden vereinigt und - wie oben beschrieben - auf ihre lipaseinhibitorische Wirkung untersucht.

2.5 Versuche zur Charakterisierung der Inhibitor-
substanz:

Die bei den Charakterisierungsversuchen angewandte Methodik wird im Abschnitt C II (Eigene Untersuchungen und Ergebnisse) unter Ziff. 3 eingehend beschrieben.

II. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

Die Tatsache, daß Proteaseninhibitoren bevorzugt in eiweißreichen Pflanzensamen zu finden sind, legt den Schluß nahe, daß in fettreichen Pflanzensamen ebenfalls ein Schutzsystem vorhanden sein müßte, welches die Lipidvorräte vor einem vorzeitigen enzymatischen Abbau bewahrt. Ausgehend von dieser Überlegung, wurde ein Lipidextrakt aus den besonders fettreichen Samen von *Papaver somniferum* L. gewonnen, auf das Vorhandensein eines antilipolytisch wirkenden Systems hin geprüft und näher untersucht.

1. Hemmtests mit Mohnlipid-Rohextrakt:

1.1 Durchführung der Hemmtests (enzymkinetische Methode):

Aus der Rohextraktlösung wurden 10 ml in einen 100 ml-Kolben abpipettiert, und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die im Kolben verbleibenden Lipide emulgiert man - wie unter „Methoden“ beschrieben.

1.1.1 Aktivitätstest:

Im Reaktionsgefäß wurden 10 ml Substrat-emulsion vorgegeben und ca. 1 min gerührt. Zwischenzeitlich konnten evtl. vorhandene saure Valenzen titriert, und die Arbeitstemperatur von 25° C erreicht werden. Anschließend wurden 2 ml Lipaselösung hinzu-

pipettiert, worauf die lipolytische Aktivität praktisch ohne Verzug einsetzte. Der Testverlauf wurde an pH-Meter und Thermometer überwacht und durch den Papierschreiber dokumentiert. Die Versuchsdauer betrug durchschnittlich 10 - 15 min. Den Kurvenverlauf bei einem Aktivitätstest zeigt Abbildung 1a.

1.1.2 Hemmtest:

Hierbei wurde zuerst die inhibitorhaltige Lipidemulsion in das Reaktionsgefäß vorgegeben, da sie erfahrungsgemäß eine relativ große Menge saurer Valenzen enthielt, die vorab titriert werden konnten. Anschließend wurden wieder 2 ml Enzymlösung zugesetzt, worauf meist eine geringe Spaltungsaktivität zu beobachten war, die sich jedoch stets nach wenigen Minuten erschöpfte. Nach Zugabe von 10 ml Substratemulsion setzte die eigentliche lipolytische Reaktion ein. Den typischen Kurvenverlauf bei einem Hemmtest zeigt Abbildung 1b.

1.1.3 Auswertung:

Aus dem Bereich, in dem die Kurve linear verlief, wurde der jeweilige Verbrauch an NaOH in $\mu\text{l}/\text{min}$ errechnet. Die Hydrolyserate im Aktivitätstest wurde gleich 100 % gesetzt, und jene im Hemmtest dazu in Relation gestellt. Die Hemmwirkung wurde somit wie folgt bestimmt:

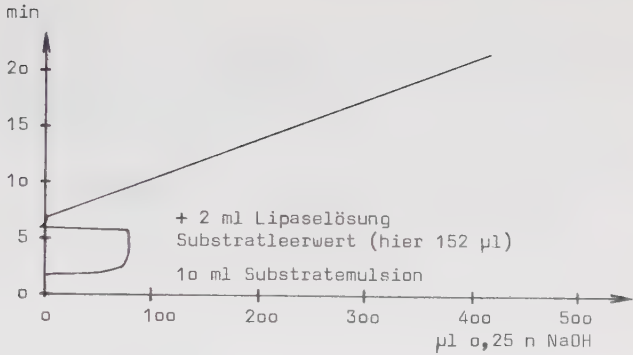


Abb. 1a. Aktivitätstest mit Lipase gegen Olivenöl-Emulsion als Substrat.

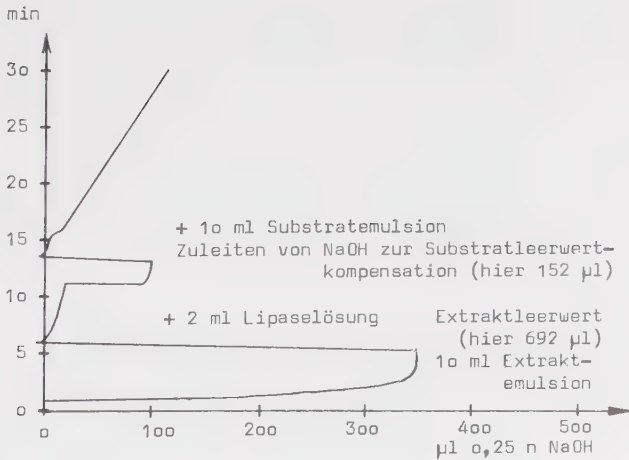


Abb. 1b. Hemmtest zur Bestimmung der Aktivität von Lipase gegenüber Olivenöl-Emulsion in Gegenwart von Mohnlipidhextrakt als Inhibitor.

inhibitorische Wirkung =

$$= 100 \% - \frac{100 \% \cdot \text{Verbrauch im Hemmtest}}{\text{Verbrauch im Aktivitätstest}}$$

1.1.4 Ergebnis der Hemmtests mit Rohextrakt:

NaOH-Verbrauch im Aktivitätstest:

26,3 µl/min

NaOH-Verbrauch im Hemmtest: 6,3 µl/min

$$\text{Hemmwirkung} = 100 \% - \frac{100 \% \cdot 6,3}{26,3} =$$

$$= 100 \% - 24 \% = 76 \%$$

Mit dem eingesetzten Rohextrakt läßt sich eine inhibitorische Wirkung von 76 % erzielen.

1.1.5 Erstellen einer Hemmkurve:

Dazu wurden von 0,05 ml bis 1 ml steigende Mengen an Mohnlipid-Rohextrakt mit Gummiarabicum-Lösung emulgiert und auf ihre lipase-inhibitorische Wirkung untersucht. Die Abhängigkeit des erreichten Hemmgrades vom eingesetzten Extraktvolumen zeigt Abbildung 2.

1.1.6 Charakterisierung des Hemmverhaltens:

Die Lipasehemmung mit Inhibitor aus Mohnextrakt ist eine Sofortreaktion, die unmittelbar nach Vermischen der Reaktionspartner nachweisbar ist. Die Hemmwirkung ist permanent, d.h. auch bei Lipaseüberschuß kommt es nach längeren Inkubationszeiten - untersucht wurden bis zu 48 h - zu keinem Abbau des Hemmstoffes.

Verbrauch
 0,25 n NaOH Hemmung (%)
 ($\mu\text{l}/\text{min}$)

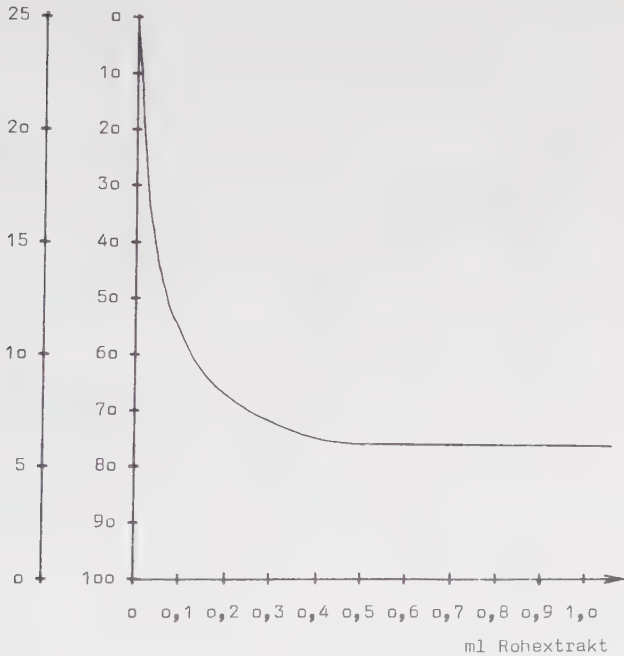


Abb. 2. Hemmkurve: Verhalten der Lipaseaktivität bei steigenden Mengen an zugesetztem Mohnlipid-Rohextrakt.

2. Isolierungsverfahren:

Die folgenden Untersuchungen und Versuche hatten zum Ziel, den Lipidextrakt möglichst differenziert in seine Bestandteile aufzutrennen und damit den Inhibitor zu isolieren.

2.1 Dünnschichtchromatographische Vorversuche mit Rohextrakt:

Kleine Mengen der Rohextraktlösung wurden mit Hilfe von Kapillarröhrchen auf vorbereitete DC-Alufolien aufgetragen und mit 17 verschiedenen Laufmitteln und -gemischen entwickelt.

Nach Besprühen der Chromatogramme mit 2',7'-Dichlorfluorescein und Betrachten in kurzwelligem UV-Licht konnten die einzelnen Lipidflecke gut lokalisiert und durch Übertragen auf Transparentpapier dokumentiert werden.

Die Ergebnisse dieser dc Tests sind der Abbildung 3 zu entnehmen. Deutlich ist daraus zu ersehen, daß das in Kammer 14 verwendete Elutionsmittelgemisch (Petroleumbenzin Kp. 40-60°, Diaethyläther, Eisessig 75:25:1) die differenzierteste Auftrennung des Rohextraktes ergab.

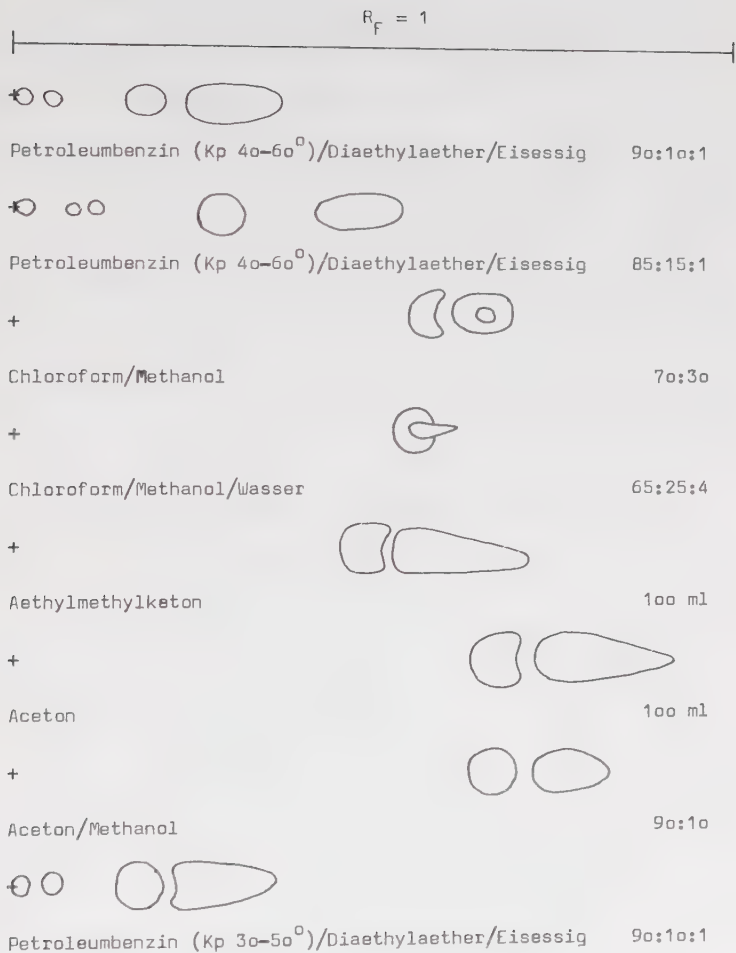
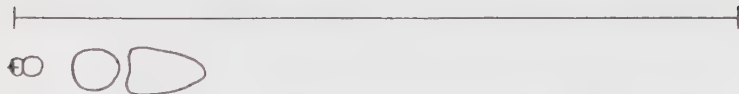


Abb. 3. Dünnschichtchromatographische Vorversuche zur Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels für den Mohnlipid-Rohextrakt.

$$R_F = 1$$



Petroleumbenzin (Kp 50-70°)/Diaethyläther/Eisessig 90:10:1



Petroleumbenzin (Kp 50-70°)/Diaethyläther/Eisessig 75:25:1



Petroleumbenzin (Kp 60-80°)/Diaethyläther/Eisessig 90:10:1



Petroleumbenzin (Kp 60-80°)/Diaethyläther/Eisessig 80:20:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60°)/Diaethyläther/Eisessig 80:20:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60°)/Diaethyläther/Eisessig 75:25:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60°)/Diaethyläther/Eisessig 70:30:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60°)/Aethylmethylketon/Eisessig 95:14:1



Petroleumbenzin (Kp 40-60°)/Aethylmethylketon/Eisessig 84:15:1

2.2. Präparative Fraktionierung des Rohextraktes mit Hilfe der Säulenchromatographie:

2.2.1 Vorbereitende Maßnahmen:

Die beiden Säulen (6 x 80 cm und 5 x 100 cm) wurden gemäß Arbeitsanleitung mit Kieselgel und dem gefundenen Lösungsmittelgemisch gefüllt und für die Chromatographie vorbereitet. (Näheres vgl. Abschnitt C I., Ziff. 2.4.2). Auf jede Säule wurden 50 g lösungsmittelfreier Mohnsamenextrakt aufgetragen; anschließend wurde fraktioniert eluiert, und die Eluate in 15 ml-Mengen mittels Fraktomaten aufgefangen.

2.2.2 Auswertung der eluierten Fraktionen:

Zur Lokalisierung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Lipide wurde der Inhalt jedes dritten Reagenzglases überprüft. Fraktionen, die Lipide mit gleichem R_F -Wert enthielten, wurden vereinigt, eingeengt und anschließend auf antilipolytische Wirkung untersucht. Die Fraktionierungsergebnisse bei den beiden Säulen unterschieden sich nur insoweit, als aus der längeren und dünneren Säule die einzelnen Lipidfraktionen etwas später ausgewaschen wurden als aus der kürzeren und dickeren. Es konnten jeweils 7 Fraktionen gefunden werden, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tab. 1: Schematische Darstellung der bei den säulenchromatographischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse.

Elutions-Nr. Säule I	Elutions-Nr. Säule II	Fraktions-Nr.	R _F -Werte der Fraktionen
0 - 47	0 - 48	ohne Inhalt	--
48 - 113	49 - 97	I	0,67
114 - 154	98 - 127	I + II	0,67+0,36
155 - 237	128 - 191	II	0,36
238 - 259	192 - 207	ohne Inhalt	--
260 - 403	208 - 279	III	0,17
ab 404	ab 280	ohne Inhalt	--

2.2.3 Untersuchung der Fraktionen auf Hemmwirkung:

Bei der Untersuchung der gewonnenen Fraktionen konnte festgestellt werden, daß die Mischfraktion I + II und besonders die Fraktion II nennenswerte lipaseinhibitorische Wirkung zeigten. Der Hemmstoff war demzufolge mit Sicherheit in Fraktion II enthalten. Mit dieser Lipidfraktion ließ sich der gleiche Hemmgrad erreichen wie mit Mohnrohextrakt.

2.2.4 Erstellung einer Hemmkurve mit Lipiden der Hemmfraktion:

Um die inhibierende Wirkung zu untersuchen,

wurde wiederum der erzielbare Hemmgrad in Abhängigkeit von der eingesetzten Lipidmenge gemessen, und eine Hemmkurve erstellt. Sie entspricht qualitativ jener, die bei der Untersuchung des Rohextraktes gefunden wurde. Vgl. Abbildung 4.

Auch hier zeigte sich, daß eine vollständige Hemmung der Lipaseaktivität trotz großem Inhibitorüberschuß nicht erreicht werden konnte. Bei dem verwendeten Enzym handelte es sich offenbar um ein Lipasengemisch, in welchem nur bestimmte Komponenten vom Inhibitor gehemmt wurden. Ähnliche Beobachtungen waren von BRAGANZA et al. (69) bei proteolytischen Enzymen gemacht worden.

2.2.5 Rechromatographie der Hemmfraktion:

Bei dünnschichtchromatographischen Vorversuchen mit 6 verschiedenen Laufmitteln bzw. -gemischen gelang es, die hemmende Lipidfraktion nochmals aufzutrennen und in weitere 3 Fraktionen zu zerlegen. Ein Gemisch aus Chloroform und Eisessig (96:4) ergab die beste Trennung. (Vgl. Abbildung 5)

Um Hemmsubstanz zu sparen wurde, auf die Technik der präparativen Schichtchromatographie zurückgegriffen. Hierfür wurden PSC-Platten der Fa. MERCK mit Kieselgel 60 F 254 und einer Schichtdicke von 2 mm verwendet. Durch mehrmaliges Auftragen von Lipid konnte insgesamt 1 ml der Hemmfraktion II - auf 10 Startpunkte verteilt -

Verbrauch
 0,25 n NaOH Hemmung (%)
 (µl/min)

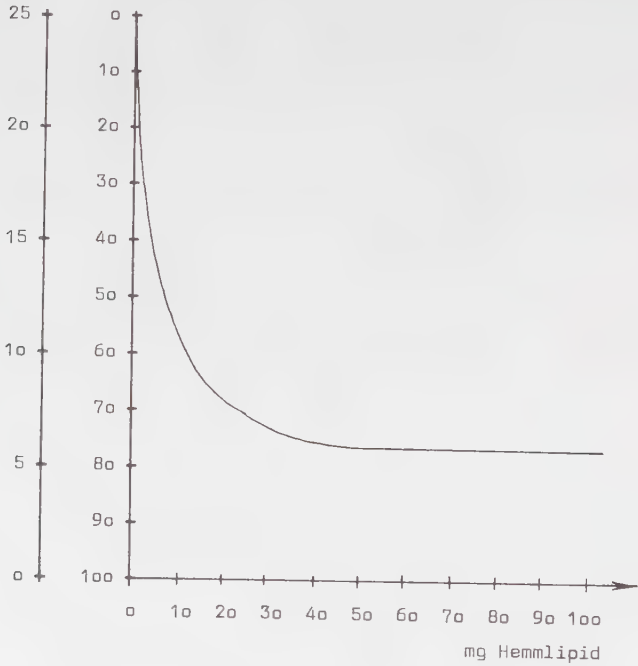


Abb. 4. Hemmkurve: Verhalten der Lipaseaktivität bei steigenden Mengen an zugesetztem inhibitorisch aktivem Lipid der Hemmfraction II.

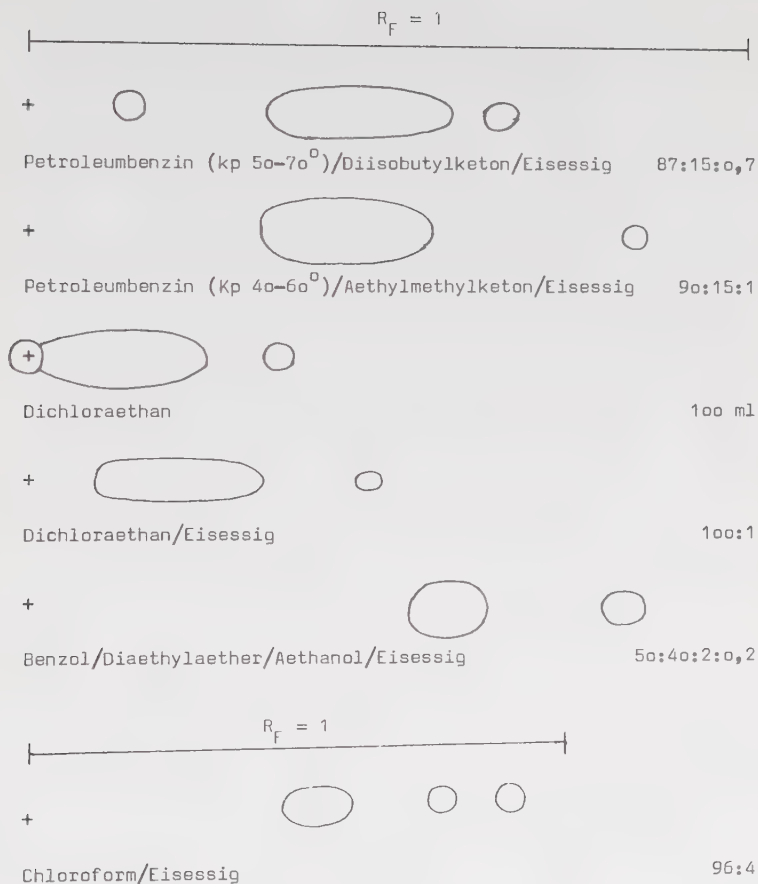


Abb. 5. Dünnschichtchromatographische Vorversuche zur Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels für die inhibitorisch aktive Fraktion II.

an die Kieselgelschicht adsorbiert werden. Die drei Fraktionen wurden nach dem Entwickeln durch Besprühen mit 2',7'-Dichlorfluorescein lokalisiert, vorsichtig von der Platte abgeschabt, mehrfach mit Aceton ausgewaschen und filtriert.

Die anschließenden Hemmtests zeigten, daß Inhibitorsubstanz in allen drei Fraktionen gleichermaßen vertreten war.

Dasselbe Ergebnis brachte auch die Rechromatographie eines Teils der Hemmfraktion II über eine MERCK-Kieselgel-Fertigsäule mit Chloroform und Eisessig (96:4) als Elutionsmittel.

3. Versuche zur Charakterisierung des Hemmlipids:

3.1 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen mit Nachweisreagenzien:

Es wurde geprüft, ob es sich bei der gewonnenen Hemmfraktion II um eine phospholipid- bzw. eine aminophosphatid-haltige Lipidverbindung handelte. Hierzu wurde etwas Hemmlipid auf DC-Platten aufgetragen und mit einem Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser (65:30:5) chromatographiert.

Als Nachweissubstanzen wurden folgende Sprühreagenzien benutzt (68):

a) Ninhydrin-Reagenz:

Dieses dient vorzugsweise zum Anfärben von Aminophosphatiden, die dabei als rotviolette Flecke auf weißem Grund erscheinen.

b) Dragendorff-Reagenz:

Mit diesem Reagenz lassen sich Cholinphosphatide nachweisen, die dann als rotorange Flecke auftreten.

c) Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz:

Damit können Phospholipide aller Art angefärbt werden und ergeben blauschwarze Flecke auf schwach grauem Grund.

Ergebnis:

Die Reaktionen zum Nachweis von Phospholipiden in der inhibitorisch aktiven Lipidfraktion II verliefen negativ.

3.2 Alkalische Hydrolyse der Hemmlipidkomponente:

Einige Milliliter der Hemmfraktion wurden mit methanolischer Kalilauge versetzt und auf diese Weise hydrolysiert. Nach Ansäuern konnte die alkoholische Phase ausgewaschen werden; das Wasser wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das gewonnene Unverseifbare - wie im folgenden beschrieben - in 3,5-Dinitrobenzoate übergeführt, wobei nach einer Arbeitsanleitung von RANDEATH (68) vorgegangen wurde.

Die Masse des Alkohols wurde bestimmt, und daraus - unter der Annahme, es handelte sich um Glyzerin - die benötigte Menge an 3,5-Dinitrobenzoylchlorid errechnet. Das Chlorid wurde zusammen mit dem Alkohol in einen kleinen Rundkolben gegeben, mit 10 ml Benzol und 0,1 ml trockenem Pyridin versetzt und 30 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 25 ml 0,1 n Schwefelsäure extrahiert, dann mit 25 ml 1 %-Sodalösung und anschließend mit Wasser. Die wäßrige Phase wurde verworfen, die organische Phase im Vakuum auf dem siedenden Wasserbad zur Trockne gebracht. Zum Rückstand wurden einige Milliliter Benzol zugesetzt, so daß eine gesättigte Lösung von 3,5-Dinitrobenzoat entstand.

Zum Vergleich wurden 3,5-Dinitrobenzoate von (1,2)-Propandiol, (1,3)-Propandiol, Glyzerin und Aethylenglycol nach der oben beschriebenen Methode hergestellt.

Die gewonnenen Substanzen wurden wie gewohnt auf DC-Fertigplatten aufgetragen, und das Lösungsmittel mit dem Fön verdunstet. Als Laufmittel wurde ein Gemisch von Toluol und Essigsäureaethylester verwendet, das bei STAHL (67) empfohlen wird. Die Chromatographie erfolgte in gesättigter Kammeratmosphäre. Bei Betrachten in kurzwelligem UV-Licht (254 nm) oder nach Besprühen mit Rhodamin B konnten die Substanzflecke lokalisiert werden.

Ergebnis:

Die dc ermittelten R_F -Werte des Hemmlipid-alkohol-3,5-Dinitrobenzoates und die des Glycerin-3,5-Dinitrobenzoates zeigten Übereinstimmung, während die R_F -Werte der anderen Vergleichsester deutliche Abweichungen aufwiesen.

Zur Kontrolle wurden die o.g. 3,5-Dinitrobenzoate in weiteren dc Tests mit folgenden Laufmitteln entwickelt:

Aethylmethylketon,

n-Butanol,

n-Butanol + Methanol (95:5),

H₂O-gesättigtes n-Butanol.

Die Ergebnisse entsprachen qualitativ denen mit Toluol / Essigsäureaethylester als Laufmittel, wobei wassergesättigtes n-Butanol die stärkste Elutionswirkung zeigte. Somit war die Alkoholkomponente des Hemmlipids eindeutig als Glycerin identifiziert.

3.3 Weitere Untersuchungsverfahren zur Identifizierung des Hemmlipids:

Für die folgende Testreihe wurde die Hypothese, es könnte sich bei dem Hemmlipid um ein nicht reines Triglycerid handeln, zum Ausgangspunkt genommen. Es wurde versucht, Hemmlipid mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in der oben beschriebenen Weise umzusetzen und so freie OH-Gruppen zu verestern. Ebenso wurden 3,5-Dinitrobenzoate mit folgenden synthetischen Fettsäureestern hergestellt:

- 1,3-Dipalmitin,
- 1,3-Dimyristin,
- 1,2-Dimyristin,
- 1,2-Dipalmitin,
- 1-Monopalmitin.

Die gewonnenen Substanzen wurden wiederum mit Toluol / Essigsäureäthylester (9:1) chromatographiert.

Ergebnis:

In keinem Falle ließen sich übereinstimmende R_F -Werte finden. Die Identität der fettsauren Komponenten der antilipolytisch wirkenden Fraktion konnte in diesem Versuch nicht geklärt werden.

Jedoch ließ sich dc nachweisen, daß das mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid umgesetzte Lipid verändert aus der Reaktion hervorgegangen war: es zeigte einen wesentlich kleineren R_F -Wert als natives Hemmlipid. Daraus kann geschlossen werden, daß es in der Tat zu Veresterungen von

3,5-Dinitrobenzoylchlorid mit freien OH-Gruppen der Inhibitorglyceride gekommen war; es handelt sich bei der Hemmlipidfraktion offenbar um kein reines Triglyceridgemisch. Der Anteil an Di- bzw. Monoglyceriden konnte jedoch nicht quantitativ festgestellt werden.

Als nächstes wurde versucht, Hemmlipid mit Palmitylchlorid zu verestern. Die dabei freigesetzte HCl wurde mit NaOH neutralisiert.

Die gewonnene Substanz wurde zusammen mit folgenden Vergleichsstoffen chromatographiert: nativer Inhibitor,

1,3-Dipalmitin,

1,3-Dimyristin,

1,2-Dimyristin,

1,2-Dipalmitin,

1-Monopalmitin.

Als Laufmittel diente das für Glyceride gut geeignete Gemisch aus Petroleumbenzin + Diaethyläther + Eisessig (75:25:1).

Ergebnis:

Wiederum konnten keine übereinstimmenden R_F -Werte gefunden werden.

Eine Reaktion des Hemmlipids bei der Umsetzung mit Palmitylchlorid war jedoch nachzuweisen, da der R_F -Wert des Produktes deutlich kleiner war als der des nativen Inhibitors. Es dürfte somit eine Veresterung mit freien OH-Gruppen der Hemmglyceride stattgefunden haben, so daß die oben aufgestellte Hypothese, es könnte sich bei dem Hemmlipid um ein nicht reines Neutralfett handeln, durchaus berechtigt erscheint.

D Zusammenfassung

Im Verlaufe der Untersuchungen zu dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Lipidextrakt aus Samen von *Papaver somniferum* L. eine inhibitorische Wirkung gegenüber Schweinepankreaslipase besitzt. Damit bestätigte sich die Theorie, daß natürliche Enzyminhibitoren häufig zusammen mit dem jeweiligen Substrat vorkommen und ihm im chemischen Aufbau ähnlich sind.

Für die Lipaseaktivitätsbestimmung wurde zuerst eine Testmethode angewandt, bei der die Hydrolyserate nach 30 min Inkubierung der Reaktionspartner durch Titration bestimmt wurde. Nachdem ein Autotitrator hatte zur Verfügung gestellt werden können, war es möglich, ein enzymkinetisches Verfahren zu entwickeln, mit welchem die lipolytische Aktivität der Pankreaslipase bei jedem Testansatz ständig verfolgt werden konnte. Diese Untersuchungsmethode erwies sich gegenüber dem ersten Verfahren in Bezug auf einfache Durchführbarkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als überlegen.

Durch säulenchromatographische Fraktionierung konnte Mohnlipidrohextrakt in fünf Komponenten aufgetrennt werden. Die hemmende Fraktion II ließ sich dc und sc in weitere drei Bestandteile zerlegen, die jedoch alle gleichermaßen inhibitorische Aktivität aufwiesen.

Der gewonnene Inhibitor vermag Pankreaslipase
immediat und permanent zu hemmen.

Untersuchungen zur Identifizierung des inhibitorisch aktiven Lipids zeigten, daß es sich eindeutig um Glyceride, jedoch keinesfalls ausschließlich um Triglyceride handelt. Eine quantitative Bestimmung der Anteile an Di- bzw. Monoglyceriden gelang nicht. Ebenso wenig führten vergleichende dc Untersuchungen mit verschiedenen synthetischen Fettsäureestern zu dem Ziel, die Identität der Hemmlipidfettsäuren festzustellen. Dazu bedarf es offenbar noch subtilerer Verfahren. Eventuell können mit Hilfe gaschromatischer Untersuchungen die Struktureigenheiten des Hemmlipids aufgedeckt und seine lipaseinhibitorische Potenz geklärt werden.

Nachdem in Pankreaslipase ein wesentlicher pathogenetischer Faktor bei der Entstehung einer akuten Pankreatitis gesehen werden kann, käme einem natürlichen Lipaseinhibitor große pharmakologische und therapeutische Bedeutung zu. Die Erforschung von Lipasehemmstoffen aus pflanzlichen und tierischen Geweben sollte daher mit Nachdruck fortgeführt werden.

E Literaturverzeichnis

1. CREUTZFELDT, W., H.D. SÖLING, H. KETTERER,
Klin. Wschr. 41, 1002 (1963)
2. CREUTZFELDT, W., H. SCHMIDT, I. HORBACH, Klin.
Wschr. 43, 15 (1965)
3. CREUTZFELDT, W., H. SCHMIDT, Scand. J. Gastro-
ent. 6, 47 (1970)
4. SCHMIDT, H., W. CREUTZFELDT, Verh. dtsch. Ges.
inn. Med. 72, 719 (1966)
5. SCHMIDT, H., Der Internist, 3, 105 (1970)
6. GEOKAS, M.C., Arch. Pathol. 86, 135 (1968)
7. GEOKAS, M.C., H. RINDERKNECHT, V. SWANSON, Lab.
Invest. 19, 235 (1968)
8. GEOKAS, M.C., R. MURPHY, R.D. McKENNA, Arch.
Pathol. 86, 117 (1968)
9. HAFTER, E., Praktische Gastroenterologie,
Thieme-Verlag, Stuttgart, 473 (1973)
10. CHIARI, H., Z. Heilkunde, 17, 69 (1896)
11. THAL, A.P., J.F. PERRY, W. EGNER, Surg. Gynaec.
Obstet. 105, 191 (1957)
12. ANDERSON, M.C., S.B. NEEDLEMAN, L. GRAMATICA,
Arch. Surg. 92, 185 (1969)
13. BALO, J., Beitr. path. Anat. 92, 14 (1933)
14. WANKE, M., Experimentelle Pankreatitis, Thieme-
Verlag, Stuttgart (1968)
15. SCHMIDT, H., W. CREUTZFELDT, T. Gastroent.
(1970)
16. MAGEE, W.L., J. GALLAI-HATCHARD, H. SANDERS,
R.H.S. THOMPSON, Biochem. J., 83, 17 (1962)
17. SCHMIDT, H., W. CREUTZFELDT, E. HABERMANN,
Klin. Wschr. 45, 163 (1967)
18. BALDAUF, A., Inaugural-Dissertation, Med. Fak.
Univ. München (1976)
19. BUDDECKE, E., Grundriß der Biochemie,
de-Gruyter-Verlag, Berlin, 24 (1971)

20. BAUER, E., K. FREY, H. KRAUT, E. WERLE, Naturwiss. 17, 672 (1929)
21. VOGEL, R., J. TRAUTSCHOLD, E. WERLE, Natürliche Proteinase-Inhibitoren, Thieme-Verlag, Stuttgart (1966)
22. FRITZ, H. (Hrsg.), Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, de-Gruyter-Verlag, Berlin (1971)
23. MANSFIELD, V., A. ZIEGELHOEFFER, Z. HORAKOVA, J. HLADOVEC, Naturwiss. 46, 172 (1959)
24. HOCHSTRASSER, K., Persönliche Mitteilung 1973
25. HOCHSTRASSER, K., H. FEUTH, E. WERLE, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 855 (1972)
26. FEUTH, H., Inaugural-Dissertation, Med. Fak. Univ. München (1974)
27. HOPPE-SEYLER, THIERFELDER, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, VI, B, 877, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
28. RICK, W., Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 530 (1969)
29. RICK, W., K. HEINKEL, H. SCHMIDT, K. SICKINGER, Störungen der Verdauung und Resorption, Wissenschaftliche Berichte, Merck, Darmstadt (1971)
30. DESNUELLE, P., P. SAVARY, J. Lipid Res. 4, 369 (1963)
31. MAYLIÉ, M.F., M. CHARLES, P. DESNUELLE, Biochim. Biophys. Acta, 178, 196 (1969)
32. DESNUELLE, P., Biochemie, 53, 841 (1971)
33. MENDEL, B., D.K. MYERS, J.E. ULYDERT, A.C. RUYS, W.M.D. BRUYN, Brit. J. Pharmacol. 8, 217 (1953)
34. ALDRIDGE, B.N., Biochem. J. 53, 110 (1953)
35. AUGUSTINSSON, K.B., Nature, 181, 1786 (1958)
36. VOGEL, W.H., L. ZIEVE, Clin. Chem. 9, 963 (1968)
37. KING, J., Practical Clinical Enzymology, D. van Nostrand Company Ltd., London, 252 (1965)
38. COHEN, M., R.G.H. MORGAN, A.F. HOFMANN, Gastroenterology, 60, 1 (1971)
39. MUNK, J., Arch. Pathol. Anat. Physiol. 80, 10 (1880)

40. SENIOR, J.R., Lipid Res. 5, 485 (1964)
41. Di NELLA, R.R., H.C. MING, C.R. PORK, J. biol. Chem. 235, 3076 (1960)
42. POPE, J.L., J.C. McPHERSON, H.C. TIDWELL, J. biol. Chem. 241, 2306 (1966)
43. SELIGMAN, A.M., P. GLOTZER, Bull. New Engl. Med. Center, 12, 28 (1950)
44. SELIGMAN, A.M., M.M. NACHLAS, J. clin. Invest. 29, 31 (1950)
45. NOTHMAN, M.M., J.H. PRATT, A.D. CALLOW, A.M.A. Arch. internat. Med. 100, 221 (1957)
46. GOEBELL, H., Internist, 3, 117 (1970)
47. RICK, W., Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74, 230 (1968)
48. RICK, W., F.W. SCHMIDT, Prakt. Enzymologie, R.-Huber-Verlag, Bern-Stuttgart, 160 (1968)
49. PSCHYREMBEL, W., Klinisches Wörterbuch, de-Gruyter-Verlag, 892 (1972)
50. JULIEN, R., P. CANIONI, J. RATHELOT, L. SARDA, T.H. PLUMMER jr., Biochim. Biophys. Acta, 280, 215 (1972)
51. RICK, W., Internist, 11, 110 (1970)
52. RICK, W., in K. HEINKEL & H. SCHÖN (Hrsg.), Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964)
53. BENZONANA, G., P. DESNUELLE, Biochim. Biophys. Acta, 164, 47 (1968)
54. ENTRESSANGLES, B., P. DESNUELLE, Biochim. Biophys. Acta, 159, 285 (1968)
55. BENZONANA, G., Biochim. Biophys. Acta, 151, 137 (1968)
56. BORGSTRÖM, B., C. ERLANSON, Eur. J. Biochem. 37, 60 (1973)
57. WILLSTÄTTER, R., E. WALDSCHMIDT-LEITZ, E. MEMMEN, Z. physiol. Chem. 125, 93 (1923)
58. BALLS, A.K., M.B. MATLACK, J.W. TUCKER, J. Biol. Chem. 122, 125 (1937)
59. DIETMANN, K., W. JUKRAN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 269, 497 (1971)

60. KLISSIUNIS, M., M. MYCONIATIS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 269, 469 (1971)
61. MATTSON, F.H., R.A. VOLPENHEIN, L. BENJAMIN, J. Biol. Chem. 245, 5335 (1970)
62. TIETZ, N.W., T. BORDEN, J.D. STEPLETON, Amer. J. Clin. Pathol. 31, 148 (1959)
63. WEBER, H., Dtsch. med. Wschr. 90, 1170 (1965)
64. BORGSTRÖM, B., in Biochemical Problems of Lipids, ed. by G. POPJAK and E. LE BRETON, Butterworth Scientific Publications, 179 (1956)
65. WILLS, E.D., Biochim. Biophys. Acta, 40, 481 (1960)
66. MARCHIS-MOUREN, G., L. SARDA, P. DESNUELLE, Arch. Biochem. Biophys., 83, 309 (1959)
67. STAHL, E., Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)
68. RANDERATH, K., Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1975)
69. BRAGANZA, B.M., Y.M. SAMBRAY, R.Y. SAMBRAY, Eur. J. Biochem. 13, 410 (1970)

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. et med. habil.
K. Hochstraßer für die Überlassung des Themas und
die freundliche Unterstützung bei der Durchführung
dieser Arbeit.

Lebenslauf

10. 2. 1948 geboren in Augsburg
Vater: Heinz Schwinghammer,
Techn. Inspektor, + 1960
Mutter: Gertrud Johanna,
geb. Roetzler
- 1954 - 1958 Volksschule Bei St. Anna in Augsburg
- 1958 - 1967 Realgymnasium in Augsburg
- 1967 Abitur
- 1967 - 1974 Studium der Zahnheilkunde an der
Ludwig-Maximilians-Universität in
München
- 1974 Zahnärztliche Prüfung und Bestallung
- 1975 - 1976 Ableistung des Wehrdienstes
- 1976 - 1977 Assistent bei Dr. Chr. Haberl,
Landsberg/Lech



